

CD44 陽性ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 の細胞増殖に対する SN-38 と
分子標的薬との併用効果

南部 俊之

明海大学大学院 歯学研究科

歯学専攻

(指導：嶋田 淳 教授)

Combined Effects of SN-38 and Molecular Target Drug on Cell Growth of CD44
Positive Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line HSC-2

Toshiyuki NANBU

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor : Prof. Jun SHIMADA)

要旨

近年のがん研究において、がん幹細胞（Cancer Stem Cells: CSCs）が注目されている。腫瘍組織内にはがん幹細胞と非がん幹細胞が混在していると考えられ、がん幹細胞は「腫瘍内に存在し、自己複製能と腫瘍組織を構成するさまざまな系統の癌細胞を生み出す能力を併せもつ細胞」と定義されている。また、がん幹細胞は放射線や抗癌剤に対する治療抵抗性を保有することから、腫瘍の悪性度と関連し、再発や転移との相関を示すことが分かってきている。一方、頭頸部扁平上皮癌においては CD44, aldehyde dehydrogenase, CD133 などががん幹細胞のマーカーであると考えられてきているが、ヒト口腔扁平上皮癌におけるがん幹細胞に対する効果的な治療法が確立されていない。そこで我々は、ヒト口腔扁平上皮癌のがん幹細胞の特徴を解明し、がん幹細胞を標的とする効果的な化学療法を探索した。

頭頸部扁平上皮癌におけるがん幹細胞のマーカーである CD44 は全てのヒト口腔扁平上皮癌細胞株で発現しており、その CD44 陽性画分の細胞は幹細胞マーカーである Nanog, SOX-2 を強力に発現していた。また HSC-2 の母集団より CD44 陽性細胞の方が移行能を有意に保持し、がん幹細胞の特徴を有することを確認した。さらに CD44 陽性細胞に対する様々な化学療法剤の感受性を検討した結果、gefitinib, elrotinib, lapatinib, SN-38 の各々の単独投与よりも、gefitinib と SN-38 との併用、elrotinib と SN-38 の併用、lapatinib と SN-38 の併用投与で、低濃度にてヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖抑制効果が認められ、同時に CD44 発現を減弱させ、さらにはアポトーシスが誘導される効果が認められた。

これらの結果から、これらの併用化学療法がヒト口腔扁平上皮癌におけるが

ん幹細胞の自己増殖や未分化能を標的とする新たなストラテジーとなる可能性が示唆された.

引用用語 : gefitinib, elrotinib, SN-38, CD44, Aldehyde dehydrogenase, CD133, 口腔扁平上皮癌細胞

Abstract

In recent years, cancer stem cells (Cancer Stem Cells: CSCs) have been drawn attention in cancer research. Accumulating evidence has suggested that the CSCs model postulates a hierarchical organization of cells such that only a small subset is responsible for sustaining tumorigenesis and establishing the cellular heterogeneity inherent in the primary tumor. Although CSCs exhibit the stem cell properties of self-renewal and differentiation, they do not necessarily originate from transformation of normal tissue stem cells. And these cells seem to be the most probable candidates responsible for treatment resistance, invasion and metastasis, resulting in tumor recurrence.

On the other hand, although it has been thought that such as CD44, aldehyde dehydrogenase, CD133 are the markers of cancer stem cells in head-and-neck squamous cell carcinoma, the effective therapeutic to the cancer stem cells in human oral squamous cell carcinoma is not established.

Then, we have solved the properties of the cancer stem cells of human oral squamous cell carcinoma, and searched for the effective the cancer stem cells targeting chemotherapy.. CD44 has been known as a maker of the cancer stem cells in head-and-neck squamous cell carcinoma was expressed by all the human oral-squamous-cell-carcinoma cell lines, and the cell had expressed strongly Nanog and SOX-2 which are stem cell markers by the CD44 positive cell. Moreover, it found that the direction of CD44 positive cell retained significantly the migration ability than population of HSC-2, and

had the feature of cancer stem cells. Furthermore, As a result of examining the sensitivity of various chemotherapeutic drugs against CD44-positive cells, the effect in combination with administration of gefitinib and SN-38, or erlotinib and SN-38 or lapatinib and SN-38 was more effective rather than mono-therapy each gefitinib, erlotinib, and SN-38. These low dose chemotherapy induced reduction of CD44 expression and also lead to enhanced apoptosis. These results was suggested that these combination chemotherapies would serve as a new strategy which makes a target the self-proliferation and undifferentiated ability of cancer stem cells in human oral squamous cell carcinoma.

Key word: gefitinib, elrotinib, SN-38, CD44, Aldehyde dehydrogenase, CD133, oral squamous carcinoma cells

緒言

全てのがんに対する口腔がんの割合は1～3%であり，その80%以上が扁平上皮癌であると言われている^{1,2)}．現在の口腔扁平上皮癌における主な治療法は外科的療法，放射線療法，化学療法である．しかしながら，口腔がんの再発や転移をきたす難治性のがんも依然として存在する．さらに口腔領域は咀嚼，嚥下，発声，呼吸など，生活機能に重要な役割を果たす臓器が多く含まれており，これらが外科的療法や化学療法などの副作用により障害されると患者のQOLに深刻な影響を及ぼす³⁻⁵⁾．しかし現段階では劇的な生存率及びQOLの改善には至っていない．その理由の1つとして放射線療法や化学療法への耐性の問題がある．

近年，がん組織を構成している細胞群には階級が存在し，多くのがん細胞はこの階級の最上位に位置するごく少数のがん幹細胞から生じると考えられるようになってきている⁶⁾．がん幹細胞は増殖能力が高く自己複製能を持ち，また放射線療法や化学療法などの従来のがん治療に抵抗性を示すことが証明されている⁷⁻¹¹⁾．そのため，治療によってがん細胞が死滅し，治癒したと思われる場合でも，その多くの場合，ごく少数のがん幹細胞が残存していると考えられる．原発巣において，この残存したがん幹細胞から再びがん細胞が生じると再発となり，がん幹細胞が他の部位へ移動しがん細胞を生じると転移となると考えられている¹²⁻¹⁶⁾．しかしながら，未だヒト口腔扁平上皮癌におけるがん幹細胞に対する効果的な治療法は確立されていない．

SN-38は抗腫瘍性アルカロイドであるcamptothecinから合成誘導されたイリノテカン塩酸塩が体内で変換され，DNA合成を阻害して抗腫瘍効果を発現する．我々の先行研究において，epidermal growth factor receptor (EGFR) に対

する分子標的薬である gefitinib と SN-38 との併用療法が相乗的にヒト口腔扁平上皮癌細胞株:HSC-2 のアポトーシスを誘導し、マウスモデルにおいて腫瘍再発抑制効果が認められることを明らかにした。そのメカニズムを解析する中で、頭頸部扁平上皮癌のがん幹細胞マーカーである CD44 の発現量は EGFR 発現量と相関性があることが報告された¹⁷⁾。また近年、家畜用抗菌剤であるサリノマイシンと既存の抗癌剤との併用効果も研究されつつあり、salinomycin は、乳癌におけるがん幹細胞に対して、paclitaxel よりも 100 倍以上効果的に抑制することが明らかになっている¹⁸⁾。また、頭頸部扁平上皮癌のがん幹細胞において、salinomycin が大幅に細胞生存率を阻害し、CD44 発現を抑制し、cisplatin や paclitaxel と相乗的に働くとの報告もされている^{10, 19)}。このように、がん幹細胞を標的とする治療法の開発が進めば、腫瘍の再発や転移が抑制することが可能であると考えられる。そこで、今回我々は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株におけるがん幹細胞マーカーの 1 つである CD44 の発現を検討し、CD44 陽性口腔扁平上皮癌株 HSC-2 における分子標的治療薬の細胞増殖抑制作用について検討した。

頭頸部扁平上皮癌に対して使用されている cisplatin, 5-fluorouracil, paclitaxel, 他の代表的な抗がん剤である doxorubicin, SN-38, また EGFR を標的とした分子標的薬である gefitinib, lapatinib, elrotinib を口腔扁平上皮癌細胞 (HSC-2) に対して使用し、各々の単独投与と比較し、イリノテカンと他の抗癌剤との併用療法における口腔扁平上皮癌のがん幹細胞を標的とする効果的な化学療法を探索した。

材料と方法

試薬

SN-38 は Tokyo Chemical Industry (東京) で, elrotinib, lapatinib, cisplatin, 5-fluorouracil, paclitaxel, doxorubicin は Selleck Chemicals (Paletta Court, Burlington, Canada) で, gefitinib は LC Laboratories (Woburn, MA, USA) から購入した.

培養細胞

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, SAS, Ca9-22) は独立行政法人理科学研究所 バイオリソースセンター (つくば) から購入した. 細胞株の培養は, 100 U/ml のペニシリン G (明治製菓, 東京), 100 μ g/ml の硫酸ストレプトマイシン (明治製菓), 非動化した 10 % ウシ胎仔血清 [fetal bovine serum (FBS), JRH Bioscience, Lenexa, KS, USA] を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO BRL, Gland Island, NY, USA) を用いて, 10 cm プラスチックシャーレ (Falcon Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 中で, 37 °C 5 % CO₂ インキュベーターで培養した. HSC-2 は, Mg²⁺, Ca²⁺ を含まないリン酸緩衝液 [PBS (-)] で洗浄後, 0.25 % trypsin を用いて細胞を剥離し, 140×*g*, 5 分間遠心分離をかけて上清を除去し, 1:4 の split ratio で 4 日毎に継代培養した.

MACS 磁気細胞分離法

MACS[®] Separation Units (Magnet)(Miltenyi Biotec, Bergisch Glabach, Germany) を MACS[®] MultiStand に水平にセットし, MACS[®] カラムを

Magnet にセットする。Negative fraction 用チューブを置き、カラムを 2 ml の MACS® Buffer を加えて洗浄した。10 cm プラスチックシャーレ (Falcon Becton Dickinson, franklin lakes, NJ, USA) 中に、 0.5×10^4 cells/well の細胞数で播種し、10 %FBS 含有 DMEM にて 37 °C, 5 % CO₂ 存在下で 48 時間培養後、trypsin 処理して細胞を回収し、5°C で $300 \times g$, 10 分間遠心洗浄し、上清を除去した。再度、PBS(-) で細胞を 5°C で $300 \times g$, 10 分間遠心洗浄し、上清を除去し、サンプルを MACS® MicroBeads と anti-CD44 を 4 °C, 15 分間、反応させた後、カラムに添加し、5 ml の MACS® Buffer を加え、カラムを Magnet から取り外し、Positive fraction 用チューブにのせ、非結合細胞を除去した。5 ml の MACS® Buffer を加え、プランジャーをセットし、カラムに保持されている細胞を溶出させ、分離した。

Western Blot 法

HSC-2 細胞と MACS 磁気細胞分離装置(ミルテニーバイオテク 東京)で溶出した CD44 陽性細胞を 6 穴プレートに 1×10^6 cells/well の細胞数で播種し、10 %FBS 含有 DMEM にて 37 °C, 5 % CO₂ 存在下で 24 時間培養した。24 時間後、氷上で細胞をスクレイパーにて剥離し、遠心分離、 $1,073 \times g$, 5 分間 4 °C にかけ細胞を回収した。回収した細胞に 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) とプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Diagnostics, Basel, Switerland) を加え、cell lysis buffer (10× cell lysis buffer ; Cell Signaling, Beverly, MA, USA) を調製して 15 μ l ずつ加え、15 分間おきに 4 回攪拌した。その後、 $9,660 \times g$, 15 分 4 °C で遠心分離器にかけた後、上清を回収した。回収したサンプルは albumin を基準にしてタンパク質定量を行った。一定のタンパク質に調整するため 2×sample buffer [125 mM Tris-HCl

(PH6.8), 4 % SDS, 10 % β -mercaptoethanol, 10 % sucrose, 1 % bromophenol blue (BPB)] を添加し, 100 °C で 5 分間, 加熱処理後, 8 % ployacrylamide gel 濃度の条件で 160 V, 60 分間 SDS-ployacrylamide gel に電気泳動を行った. その後, polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Milipore, Bedford, MA, USA) に 80 V, 60 分間転写した. 転写終了後, 5 % Difco skim milk (和光純薬工業, 大阪) をブロッッキング溶液として用い, 室温にて 1 時間ブロッッキング処理を行った. 一次抗体(Table-1)は, ブロッッキング溶液で希釈して室温で 1 時間振盪させた.

一次抗体反応後, PVDF 膜は 1×TBST : Tris Buffered Saline with Tween (10×TBST; 和光純薬工業, 大阪) で 10 分間 3 回洗浄した後, 二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) を標識した goat anti-rabbit IgG もしくは goat anti-mouse IgG antibody (Santa Cruz) を 1/10,000 の濃度に希釈して室温で反応させた後, 1×TBST で再度 10 分間 3 回洗浄し, Western BLoT Chemiluminescence Luminol / Enhancer Solution, Western BLoT Chemiluminescence Peroxide Reagent (タカラバイオ, 東京) を 1 ml 添加し, 1 分間振盪させ, X 線フィルム (富士フィルム, 神奈川) に感光後, 自動現像機 (コダック・テクノサービス, 東京) で現像した.

Flow cytemetory

今回, HSC-2 と MACS 磁気細胞分離装置で溶出した CD44 陽性細胞を 6 well プレートに 1×10^6 cells/well で播き, 24 時間培養した. 培養後, trypsin 処理して細胞を回収し, 5 °C で $300 \times g$, 10 分間遠心洗浄し, 上清を除去した. 再度, PBS(-)で細胞を 5 °C で $300 \times g$, 10 分間遠心洗浄し, 上清を除去した. サンプルに 0.5% BSA+PBS(-)を 100 μ l 加え, Fc receptor blocking (FcR

blocking)を $2\mu\text{l}$, 10 分間反応させた. CD44(fluorescein isothiocyanate:FITC) および CD44(phycoerythrin:PE)またはそれぞれのアイソタイプコントロール IgG 抗体と細胞で, 5°C , 15 分間, 暗闇中で反応させ, フローサイトメーター (EPICS ALTRA, Beckman Coulter)で分析した.

Migration assay

MACS 非分離 HSC-2 細胞と MACS 磁気細胞分離装置で溶出した CD44 陽性 HSC-2 細胞を血清を含まない DMEM(血清飢餓培地)に置き換え, 4 つの各 Top Chamber (Falcon Becton Dickinson) $8\mu\text{m}$ のフィルターに 0.5×10^5 cells/well の細胞数で各細胞を 2 well ずつ播種した. 12 well plate (Falcon Becton Dickinson)の Bottom Chamber の 2 well に 10 %FBS 含有 DMEM を入れ, 残りの 2 well は血清飢餓培地の DMEM を入れた後, 細胞を播種した Top Chamber を各 well に挿入し, 37°C , 5 % CO_2 存在下で 24 時間培養した. 培養後, 各 Top Chamber を PBS (-) で洗浄した後, 6% glutaraldehyd で常温, 30 分固定し, crystalviolet(5 mg/ml)で染色した. その後 PBS (-) で洗浄し, 余分な水分を吸引し, 乾燥させた後, 光学顕微鏡にて細胞を数えた.

MTT assay

MTT[(3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole)]assay は, HSC-2 を 96 穴マイクロプレート (Falcon Becton Dickinson,) に 0.5×10^4 cells/well の細胞数で播種し, 10 %FBS 含有 DMEM にて 37°C , 5 % CO_2 存在下で 24 時間培養した. 培養後, コントロール (非処理) ならびに, 各種抗癌剤を単独処理 SN-38, gefitinib, elrotinib, lapatinib, あるいは SN-38 との併用処理を行った. 72 時間処理後, $10\mu\text{l}$ の MTT 試薬

Cell Proliferation Kit I MTT labeling reagent (Roche Diagnostics) を加えて 4 時間 37 °C で培養した。そして、100 μ l ずつ Cell Proliferation Kit I Solubilization buffer (Roche Diagnostics) を入れ 37 °C で 24 時間培養した。その後、プレートリーダー (Multiskan Bichromatic Labsystems, Helsinki, Finland) を用いて、595 nm の吸光度にて相対的生細胞数を測定した。

Statistics analysis

4 Steps エクセル統計 2010(第 2 版) 統計ソフト Statcel2(オーエムエス 埼玉)を使用し、Migration assay による薬剤細胞抑制のデータは正規性を確認後、異なる 2 群の平均間の対比較はスチューデント t 検定を実施した。MTT assay は多重検定比較 Scedge's F test を実施した。

結果

1. ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 における CD44 陽性発現の検討

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, SAS, Ca9-22) を用いて, Western Blot 法により, CD44, EGFR, リン酸化 EGFR の発現を確認したところ, がん幹細胞のマーカーである CD44 は発現の強弱はあるものの全てのヒト口腔扁平上皮癌細胞株で発現していた(Fig 1). また, EGFR, リン酸化 EGFR は HSC-2 で最も強く発現していた. HSC-2 と HSC-3 における CD44 の発現は HSC-3 の方が強く発現していた. さらに HSC-2 の CD44 の発現をフローサイトメーターを用いて検出をしたところ, HSC-2 では 29.2%, であった(Fig 2).

2. HSC-2 における CD44 陽性細胞の性状の解析

HSC-2 細胞に対し, MACS 磁気細胞分離法を用いて CD44 陽性細胞を分離し, Western Blot 法により, 非分離細胞と MACS 分離細胞の CD44 の発現を比較したところ, MACS 分離細胞で CD44 が強く発現していた(Fig3-A). さらに, MACS 分離細胞において, 幹細胞マーカーである Nanog, SOX-2 の発現が観察された(Fig3-A).

また, Migration assay にて MACS 非分離細胞と MACS 分離 CD44 陽性 HSC-2 細胞の FBS(-)遊走能の違いを比較したところ, 非分離細胞より MACS 分離 CD44 陽性細胞の方が有意に高い遊走能を示した(Fig 3-B,C).

3.CD44 陽性 HSC-2 細胞の薬剤抵抗性についての解析

現在, ヒト口腔扁平上皮癌に対して使用されている paclitaxel, 他の代表的な抗がん剤である SN-38, また EGFR を標的とした分子標的薬である gefitinib, lapatinib, elrotinib の HSC-2 MACS 分離細胞に対する 50%阻害濃度(half maximal inhibitory concentration; IC₅₀)を MTT assay にて測定し相対的生細胞数を調べ比較検討した. その結果, SN-38, paclitaxel の IC₅₀ 値は HSC-2 MACS 非分離細胞と MACS 分離細胞において, ほとんど差はみられなかった. 一方, EGFR の分子標的薬である gefitinib, lapatinib, elrotinib, 既存の抗癌剤である doxorubicin は HSC-2 MACS 分離細胞に対し IC₅₀ 値が数倍から数十倍上昇した(Table-2).

そこで, これらの IC₅₀ 値をもとに HSC-2 MACS 非分離細胞に対して, 従来の化学療法薬と分子標的薬の併用投与について比較検討した. Gefitinib(1.0 μ M)と SN-38 の併用効果の結果において, SN-38 が 0.5 (nM)または 1.0 (nM)で gefitinib と併用しても, gefitinib 単独投与とほとんど細胞増殖抑制に変化はなかった. しかしながら SN-38 が 2.0 (nM)から gefitinib との併用で顕著な細胞増殖抑制が認められた(Fig4-A). Elrotinib(1.0 μ M)と SN-38 の併用細胞増殖抑制効果は, elrotinib 単独投与と比較し, SN-38 が 0.5 (nM)と elrotinib との併用で明らかに細胞増殖抑制が認められた(Fig4-B). Lapatinib(1.0 μ M)と SN-38 の併用細胞増殖抑制効果において, SN-38 が 0.5 (nM)で lapatinib と併用しても, lapatinib 単独投与とほとんど細胞増殖抑制に変化はなかった. しかしながら, SN-38 が 1.0 (nM)以上の濃度から lapatinib との併用細胞増殖抑制効果の増加を認めた (Fig4-C). さらに, これらの結果をもとに Western Blot 法により CD44 とアポトーシス誘導能をアポトーシスのマーカーである cleaved PARP により比

較検討した結果, gefitinib と SN-38 を併用することで cleaved PARP の発現が強く誘導されていることを確認した(Fig5). また CD44 の発現は gefitinib と SN-38 を併用することで, 強く発現を減弱させた(Fig5).

これらの結果より, ヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖抑制において, EGFR 分子標的薬である gefitinib, elrotinib は, 各々の単独投与よりも, SN-38 との併用投与することで細胞増殖抑制効果が認められることが明らかとなった.

考察

がん幹細胞は自己複製能を持つ幹細胞と似た性質を備え、細胞周期が遅いこともあり放射線療法や化学療法などの従来のがん治療に抵抗性を示すことが証明されている¹³⁾。そこで近年、がん幹細胞における特異的なマーカーやその機能を解析することが新たながんの診断や治療につながると考えられている。その中で、乳癌細胞株や頭頸部扁平上皮癌における CD44 はがん幹細胞における特異的なマーカーであると臨床的研究からも証明されている^{12, 21, 22)}。

そこで、ヒト口腔扁平上皮癌における MACS 分離 CD44 陽性 HSC-2 細胞の特徴について検証した。CD44 は全てのヒト口腔扁平上皮癌細胞株で発現し(Fig 1), EGFR , p-EGFR も発現していた。頭頸部扁平上皮癌において、CD44 と EGFR は同一細胞内に局在し、CD44 発現量は EGFR 発現量と相関性があるとの報告もあり¹⁷⁾、これはヒト口腔扁平上皮癌細胞株においても関連している可能性が示唆された。

幹細胞マーカーである Nanog, SOX-2 の発現について、Nanog, SOX-2 は胚性幹細胞の多分化能や自己複製能を維持するために必要な転写調節因子で、ほとんどの正常組織で発現されていない。最近の研究ではヒトのがんにおいて過剰発現していることが報告されている^{16, 22)}。そこで、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 細胞の MACS 分離 CD44 陽性細胞における幹細胞マーカーを検証した結果、MACS 分離 CD44 陽性細胞でこれらのマーカーは強力に発現していた(Fig 3-A)。また、がん幹細胞は上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)の特徴を有し、組織の線維化やがん細胞の浸潤・転移を促進すると考えられている^{20, 23-25)}。上皮間葉転換とは、炎症、低酸素、酸化ストレスなどによりシグナル伝達が活性化されると、細胞間結合と細胞極性を持つ上皮細胞の状態から、

それらが消失，減少し，細胞の遊走性および浸潤性を示し，間葉系細胞の特徴を獲得することであり，がんの浸潤・転移の過程に関与し，予後不良因子とされている．そこで Migration assay にて上皮間葉転換の特徴の有無を確認したところ，MACS 分離 CD44 陽性細胞で遊走能が高いことが確認され，上皮間葉転換の特徴を有することが示された(Fig 3-B,C)．これらの結果により，MACS 分離 CD44 陽性細胞は，MACS 非分離細胞集団よりがん幹細胞の特徴を有する分画であることが明らかとなった．

次に，MACS 分離 CD44 陽性画分の細胞に対して，従来の化学療法薬と分子標的薬の併用効果を検討した．臨床上，抗がん剤の単独投与治療において効果を得ようとする，大量投与が必要になる．この場合，副作用が強く現れ，正常細胞にも悪影響を及ぼし，また，がん細胞が抗がん剤に対して耐性を獲得する可能性が高くなる．そこで，抗がん剤の併用投与により，各々の薬剤濃度を低減させ副作用や薬剤耐性発現を軽減し，さらにがん幹細胞に対し効果的な併用化学療法を検討することとした．従来の化学療法薬と EGFR 分子標的薬における MACS 非分離細胞と MACS 分離 CD44 陽性細胞に対する感受性の違いを検討した結果，MACS 分離 CD44 陽性細胞は gefitinib, elrotinib, lapatinib, doxorubicin に対して感受性が低下していた．一方，SN-38, paclitaxel は MACS 分離 CD44 陽性細胞に対して効果を示す可能性が示唆された(Table-2)．

そこで，これらの IC₅₀ 値をもとに MACS 非分離細胞に対して各分子標的薬と SN-38 の併用投与にて比較検討した．細胞増殖抑制効果は，各々の薬剤単独投与と比較し，gefitinib と SN-38 の併用投与，elrotinib と SN-38, lapatinib と SN-38 の併用投与で細胞増殖抑制効果が認められた(Fig 4-A,B,C)．

さらに，これらの結果をもとに Western Blot 法により CD44 とアポトーシスのマーカーである cleaved PARP を比較検討したところ，gefitinib と SN-38 を併

用することで、CD44 の発現が減弱し、アポトーシスマーカーである cleaved PARP の発現は増強し、アポトーシスが誘導された(Fig 5). そのメカニズムとして、gefitinib によって HSC-2 の CD44 の発現が抑制され、同時に SN-38 によりアポトーシスが誘導されたことで、さらに強力に CD44 発現が抑制された可能性が考えられる. CD44 の発現量は EGFR の発現量と関連しているとの報告もあることから¹⁷⁾, gefitinib によって EGFR が抑制されたことで CD44 発現の抑制とアポトーシスが誘導された可能性が示唆された.

今回明らかにした HSC-2 に対する gefitinib と SN-38 の併用投与, elrotinib と SN-38 の併用投与, または lapatinib と SN-38 の併用投与はがん幹細胞の画分を抑制し, 強力にアポトーシスを誘導することから, ヒト口腔扁平上皮癌細胞におけるがん幹細胞に有効であることが示唆され, 自己増殖や未分化能を標的とする新たな薬剤の開発に役立つ可能性がある. 今後は, 未だ明らかにされていないがん幹細胞の特徴を解明し, 治療抵抗性を有するがんやその再発に対して効果的に抑制する治療法の探索が必要であると考え.

結論

1. ヒト口腔扁平上皮癌細胞株は、がん幹細胞マーカーの 1 つである CD44 を発現していた.
2. ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 において MACS 分離 CD44 陽性細胞はがん幹細胞の特徴を有する分画である可能性が示唆された.
3. ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 に対する gefitinib と SN-38 の併用投与, または elrotinib と SN-38 の併用投与はヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 のがん幹細胞の特徴を有する分画に有効であることが示唆された.

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究に対し終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました形態系病態形態研究群口腔外科学Ⅰ 嶋田 淳 教授に深甚なる感謝の意を表します．また具体的な実験指導ならびに研究発表，論文執筆に終始御教授，御校閲を賜りました，機能系薬理研究群歯科薬理学 坂上 宏 教授，環境生態免疫系口腔生態免疫研究群口腔微生物学 大森 喜弘 教授ならびに理工系歯材応用研究群歯科補綴学Ⅱ 藤澤 政紀 教授に厚くお礼申し上げます．更に，実験の遂行に際し，施設設備の使用を快諾して下さい，多くの面にわたり御指導いただきました機能系薬理研究群歯科薬理学 梅村 直己 助教，教室員各位，MPL 職員，形態系病態形態研究群口腔外科学Ⅰの皆様に深く感謝申し上げます．最後に宮田奨励金の御援助頂きました 宮田 侑 理事長に厚く御礼申し上げます．

REFERENCES

- 1) Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF : The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence : Oral Dis. **6**, 65-74, 2000
- 2) Ahmedin J, Freddie B, Melissa M, Jacques F, Elizabeth W, David F : Global Cancer Statistics. Cancer J Clin. **61**, 69-90, 2011
- 3) Logemann JA, Pauloski BR, Rademaker AW, Colangelo LA : Speech and swallowing rehabilitation for head and neck cancer patients. Oncol. **5**, 651-656, 1997
- 4) Aarstad HJ, Aarstad AK, Birkhaug EJ, Bru E, Olofsson J : The personality and quality of life in HNSCC patients following treatment. Eur J Cancer. **13**, 1852-1860, 2003
- 5) Aarstad AK, Aarstad HJ, Olofsson J : Personality and choice of coping predict quality of life in head and neck cancer patients during follow-up. Acta Oncol. **5**, 879-890, 2008
- 6) Harrison H, Rogerson L, Gregson HJ, Brennan KR, Clarke RB, Landberg G : Contrasting hypoxic effects on breast cancer stem cell hierarchy is dependent on ER- α status. Cancer Res. **4**, 1420-1433, 2013
- 7) Ishii H, Iwatsuki M, Ieta K, Ohta D, Haraguchi N, Mimori K, Mori M : Cancer stem cells and chemoradiation resistance. Caner Sci. **99**, 1871-1877, 2008
- 8) Visvader JE, Lindeman GJ : Cancer stem cells in solid tumours accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer. **8**,

755-768, 2008

- 9) Okuda H, Xing F, Pandey PR, Sharma S, Watabe M, Pai SK, Mo YY, Iizumi-Gairani M, Hirota S, Liu Y, Wu K, Pochampally R, Watabe K : miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. *Cancer Res.* **73**, 1434-1444, 2013
- 10) Kurokawa M, Ise N, Omi K, Goishi K, Higashiyama S : Cisplatin influences acquisition of resistance to molecular-targeted agents through epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Cancer Sci.* **104**, 904-911, 2013
- 11) Koo KH, Kim H, Bae YK, Kim K, Park BK, Lee CH, Kim YN. : Salinomycin induces cell death via inactivation of Stat3 and downregulation of Skp2. *Cell Death and Dis.* **4**, e693, 2013
- 12) Major AG, Pitty LP, Farah CS : Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Stem Cells Int.* **2013**, 319-489, 2013
- 13) Visvader JE, Lindeman GJ : Cancer Stem Cells current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell.* **10**, 717-728, 2012
- 14) Allegra E, Trapasso S : Cancer stem cells in head and neck cancer. *OncoTargets And The.* **5**, 375-383, 2012
- 15) Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, Patrawala L, Yan H, Jeter C, Honorio S, Wiggins JF, Bader AG, Fagin R, Brown D, Tang DG : The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med.* **17**, 211-215, 2011
- 16) Bourguignon LY, Wong G, Earle C, Chen L : Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to

- self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J Biol Chem.* **287**, 32800-32824, 2012
- 17) Perez A, Neskey DM, Wen J, Pereira L, Reategui EP, Goodwin WJ, Carraway KL, Franzmann EJ : CD44 interacts with EGFR and promotes head and neck squamous cell carcinoma initiation and progression. *Oral Oncol.* **45**, 432-438, 2012
 - 18) Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES : Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell.* **4**, 645-659, 2009
 - 19) Kuo SZ, Blair KJ, Rahimy E, Kiang A, Abhold E, Fan JB, Wang-Rodriguez J, Altuna X, Ongkeko WM : Salinomycin induces cell death and differentiation in head and neck squamous cell carcinoma stem cells despite activation of epithelial-mesenchymal transition and Akt. *BMC Can.* **12**, 556, 2012
 - 20) Trapasso S, Allegra E : Role of CD44 as a marker of cancer stem cells in head and neck cancer. *Biol.* **6**, 379-683, 2012
 - 21) Judd NP, Winkler AE, Murillo-Sauca O, Brotman JJ, Law JH, Lewis JS Jr, Dunn GP, Bui JD, Sunwoo JB, Uppaluri R : ERK1/2 regulation of CD44 modulates oral cancer aggressiveness. *Cancer Res.* **72**, 365-374, 2012
 - 22) Gen Y, Yasui K, Nishikawa T, Yoshikawa T : SOX2 promotes tumor growth of esophageal squamous cell carcinoma through the AKT/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling pathway. *Cancer Sci.* **104**, 810-816, 2013

- 23) Chang CC, Hsu WH, Wang CC, Chou CH, Kuo MY, Lin BR, Chen ST, Tai SK, Kuo ML, Yang MH : Connective tissue growth factor activates pluripotency genes and mesenchymal-epithelial transition in head and neck cancer cells. *Cancer Res.* **52**, 285-287, 2013
- 24) Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, Fujii M, Hasegawa Y, Ogawa T, Murakami S, Kondo E, Nakanishi H : Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3beta/snail signalling pathway. *Br J Cancer.* **106**, 1196-1204, 2012
- 25) Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, Ohshiro K, Rosenthal DI, Weber RS, Gallick GE, El-Naggar AK : Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer.* **112**, 2088-2100, 2008

Figure Legends

Figure1. Expression of signaling molecules in human oral squamous cell carcinoma cell lines.

Cell lysates from exponentially growing cells were analyzed by Western blot analysis using antibodies against the indicated proteins. The results shown are representative of 3 experiments with similar results .

Figure2. Isolation of human oral squamous cell carcinoma cell culture.

Non-isolated HSC-2 cells were assessed for CD44 expression by flow cytometry and showed 29.2% positive for CD44. A nonspecific IgG antibody was used as a negative control.

Figure3. Characteristics of CD44 positive cells in human oral squamous cell carcinoma cell lines.

Western blot assay shows expression level of CD44(+) cell compared to non-isolation cell (A). The results shown are representative of 3 experiments with similar result. Boyden chamber cell migration assay was performed in non-isolation cells (B). CD44 positive cells were pretreated with or without 10%FBS after 24h. Photomicrographs of migrated cells stained by crystal violet in oral squamous cell carcinoma HSC-2 (B). Using a light microscope

enumerate the number of stained cells in decided 5 fields (middle,top,under,light,left) within each transwell insert. Count and average the total number of cells in each of the decided 5 fields within an insert. There was significant difference between non isolation cell and CD44(+) cell (C). Asterisks indicate statistical significance determined by unpaired two-tailed Student's t test, $p < 0.05$ (*). The results shown are representative of 3 experiments with similar results.

Figure4. Effect of combination treatment with molecularly-targeted drugs and SN-38 in CD44 positive HSC-2.

Effect of gefitinib + SN-38 (A), erlotinib + SN-38(B), lapatinib + SN-38 (C) of CD44 positive HSC-2 in percent of growth inhibition.

MTT assay shows gefitinib + SN-38, erlotinib + SN-38, lapatinib + SN-38 causes a selective decrease in proliferation compared to gefitinib alone.

HSC-2 was treated with gefitinib, SN-38 alone and combination with gefitinib ($0.1 \mu\text{M}$) and SN-38 (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 nM) (A)

Combined treatment with gefitinib ($0.1 \mu\text{M}$) and SN-38 (2.0–5.0 nM) was significantly inhibited the cell growth compared with gefitinib alone($p < 0.05$, Scheffe's F test).

HSC-2 was treated with erlotinib, SN-38 alone and combination with erlotinib ($0.1 \mu\text{M}$) and SN-38 (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 nM) (B)

Combined treatment with gefitinib ($0.1 \mu\text{M}$) and SN-38 (0.5–4.0 nM) was significantly inhibited the cell growth compared with gefitinib alone($p < 0.05$,

Scheffe's F test).

HSC-2 was treated with lapatinib, SN-38 alone and combination with lapatinib ($0.1 \mu\text{M}$) and SN-38 (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 nM) (C)

Combined treatment with gefitinib ($0.1 \mu\text{M}$) and SN-38 (3.0–4.0 nM) was significantly inhibited the cell growth compared with gefitinib alone ($p < 0.05$, Scheffe's F test).

Figure5. CD44 expression and cell apoptosis induction of each medicine against HSC-2.

CD44 and PARP cleavage of an apoptosis marker were detected by immunoblotting . HSC-2 was treated with non-isolation , SN-38 (2nM), gefitinib ($10 \mu\text{M}$), and combination with gefitinib and SN-38 . The expected value is value of the combined effect (%) was defined as: effects of SN-38 alone \times effects of gefitinib $\times 100\%$. CD44 and Cleaved PARP were observed by immunoblotting in gefitinib alone and gefitinib and SN-38 .

Table-1 Antidodies used in this study

Antibody		dilution	Vendor
rabbit anti-human cleaved PARP	polyclonal	1/1000	Cell signaling
rabbit anti-human EGFR	polyclonal	1/1000	Cell signaling
rabbit anti-human posphorylated-EGFR	polyclonal	1/1000	Cell signaling
rabbit anti-human CD44	polyclonal	1/1000	Cell signaling
mouse anti-human β -Actin	monoclonal	1/1000	Santa Cruz

Table-2 IC₅₀值

		HSC-2 Non isoiation	HSC-2 CD44(+)
SN-38	μ M	0. 004±0. 001	0. 006±0. 001
paclitaxel	μ M	0. 004±0. 001	0. 009±0. 005
gefitinib	μ M	2. 204±0. 674	7. 267±2. 108
erlotinib	μ M	0. 466±0. 0334	14. 778±0. 671
lapatinib	μ M	9. 994±4. 175	29. 771±3. 285
doxorubicin	μ M	0. 063±0. 020	0. 541±0. 191

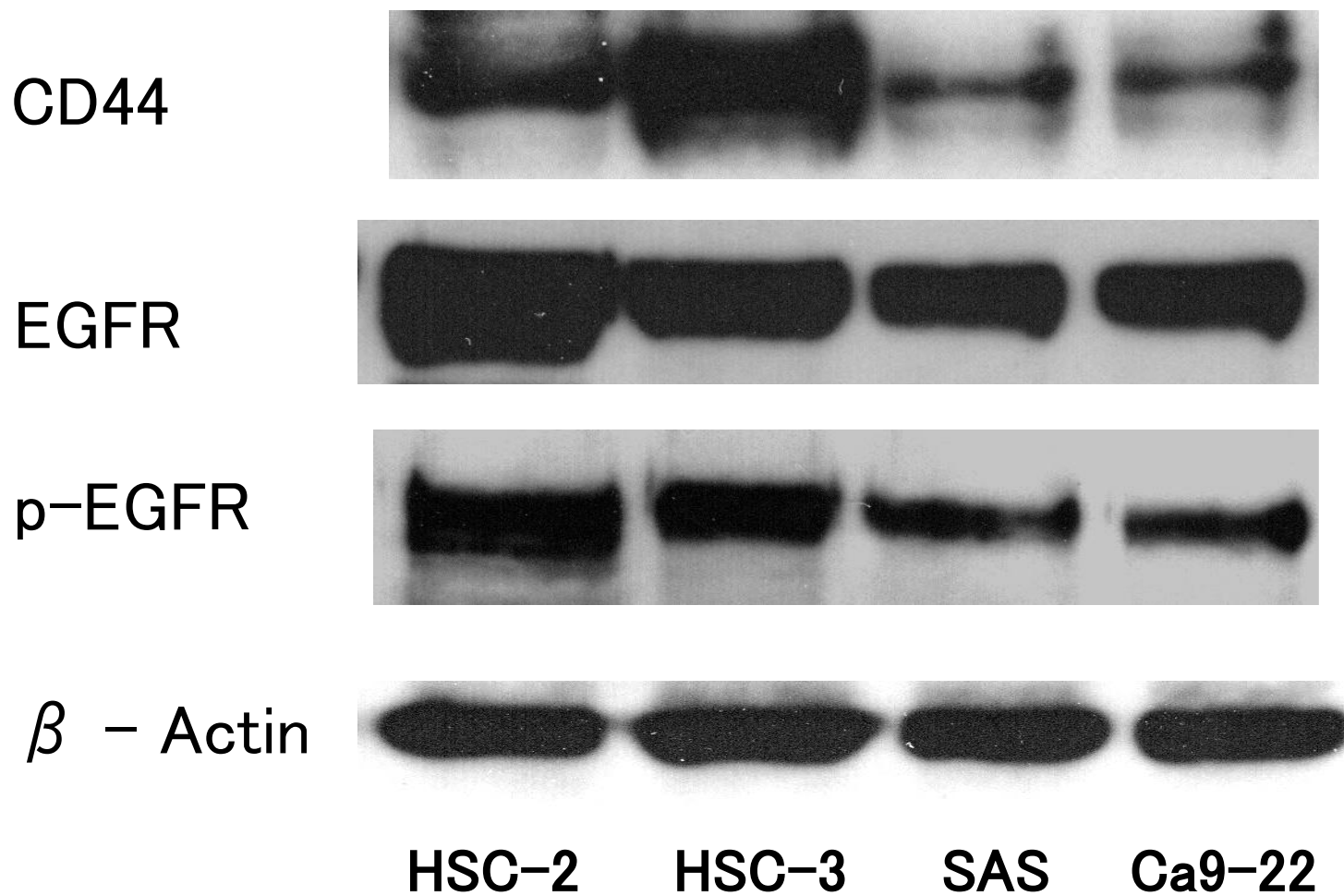


Fig 1

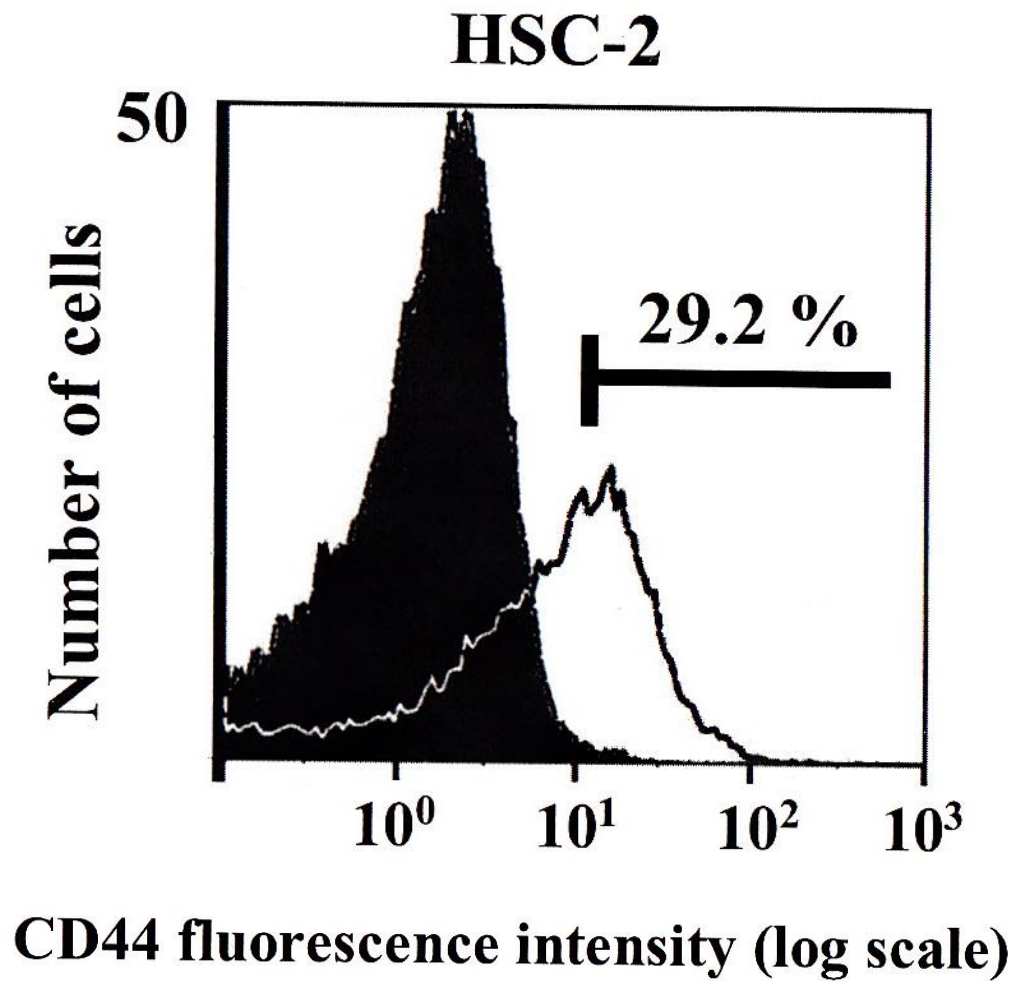


Fig 2

HSC-2

CD44



β - Actin



Non isolation

CD44 +

HSC-2

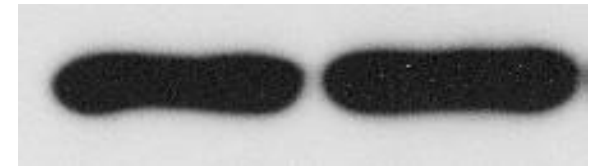
Nanog



SOX-2



β - Actin



Non isolation

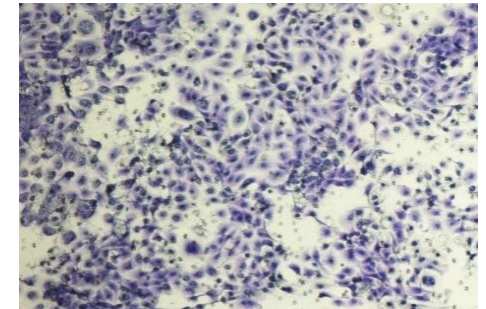
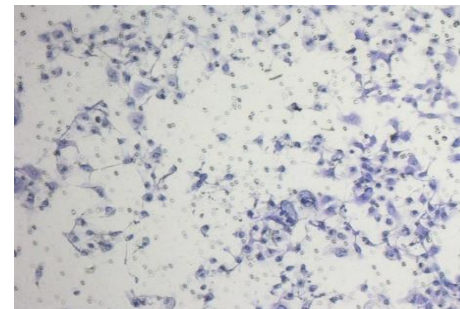
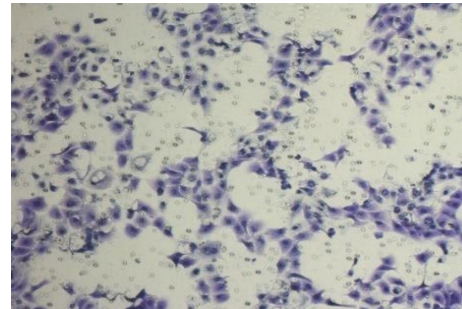
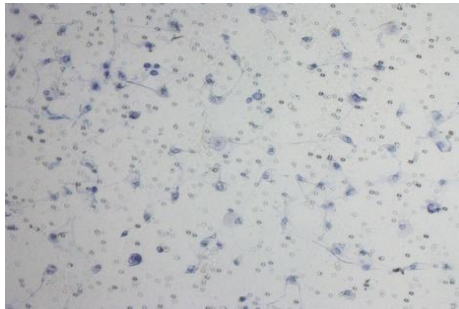
CD44 +

Fig 3-A

HSC-2

Non isolation

CD44 + cell



FBS

—

+

—

+

Fig 3-B

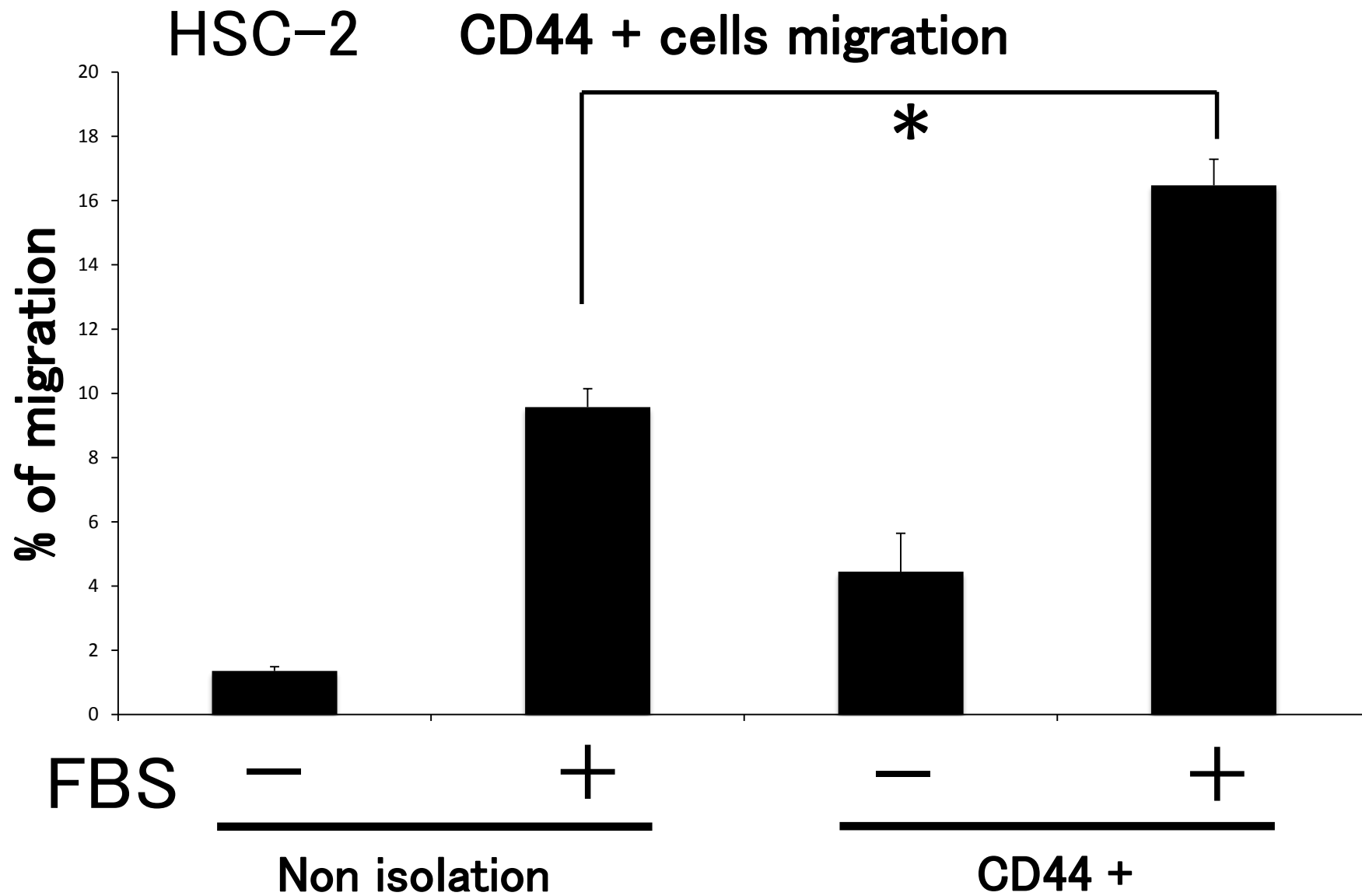


Fig 3-C

Gefitinib (0.1 μ M)

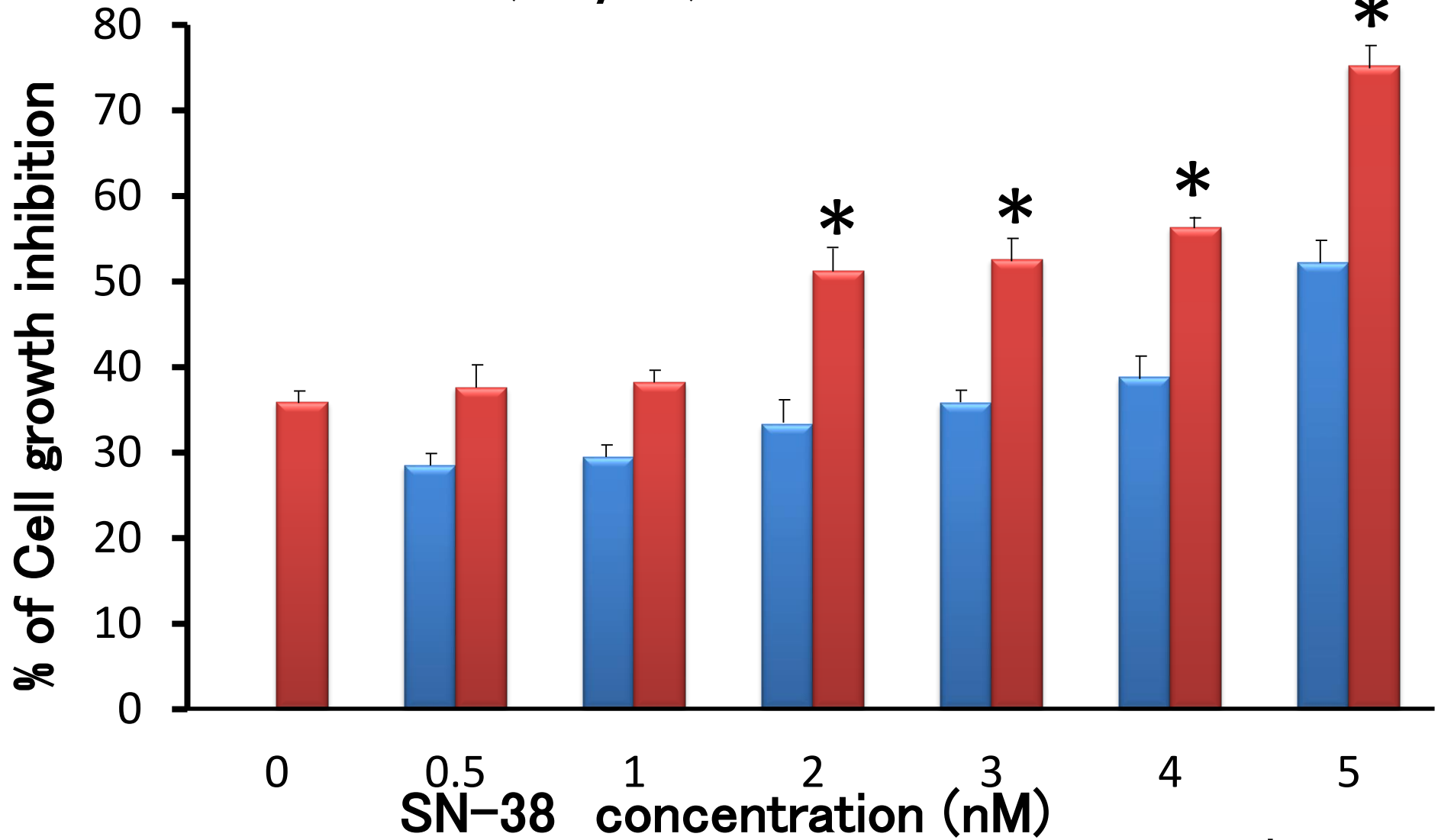


Fig 4-A

Scheffe's F test

Erlotinib (0.1 μ M)

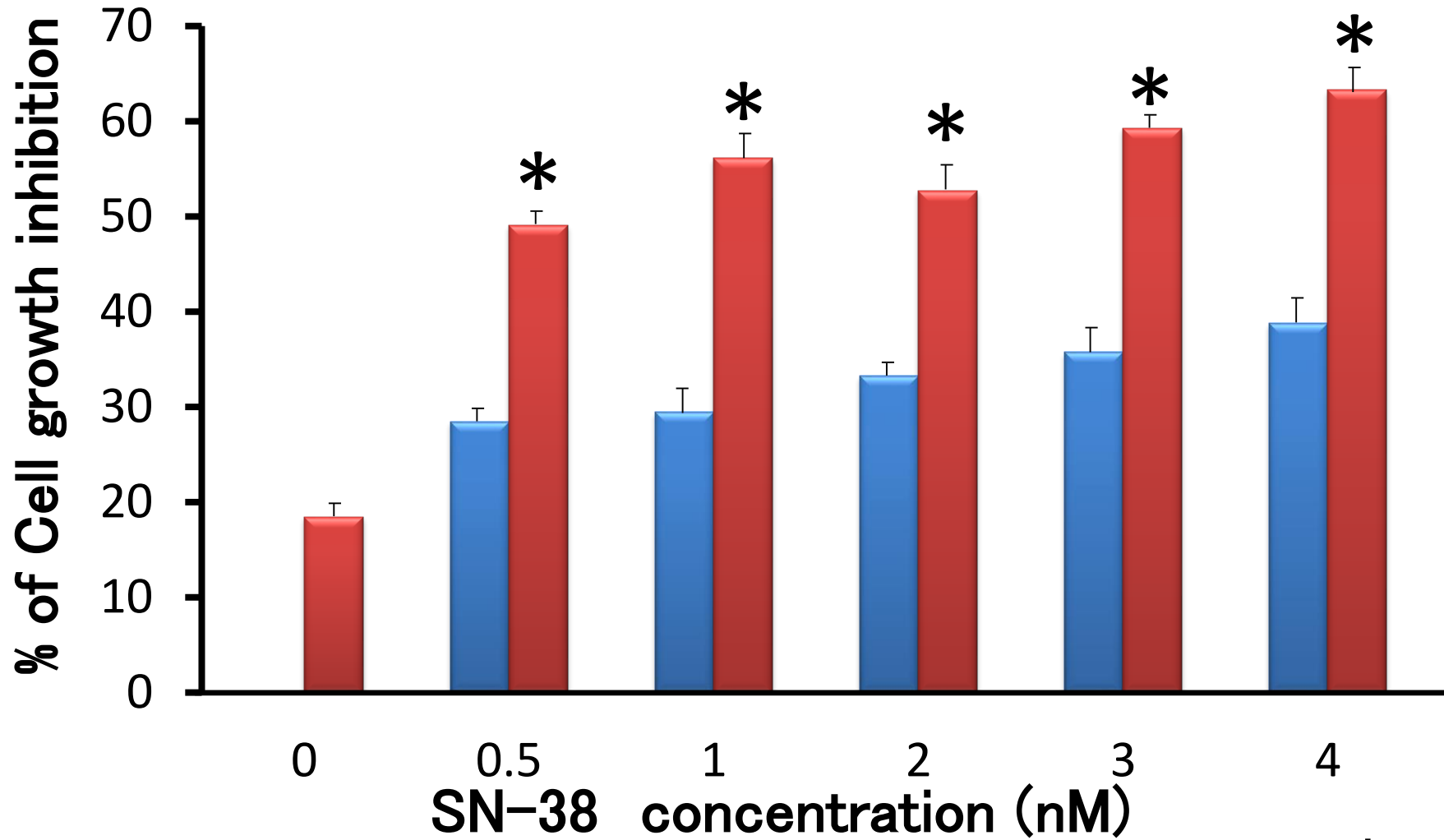
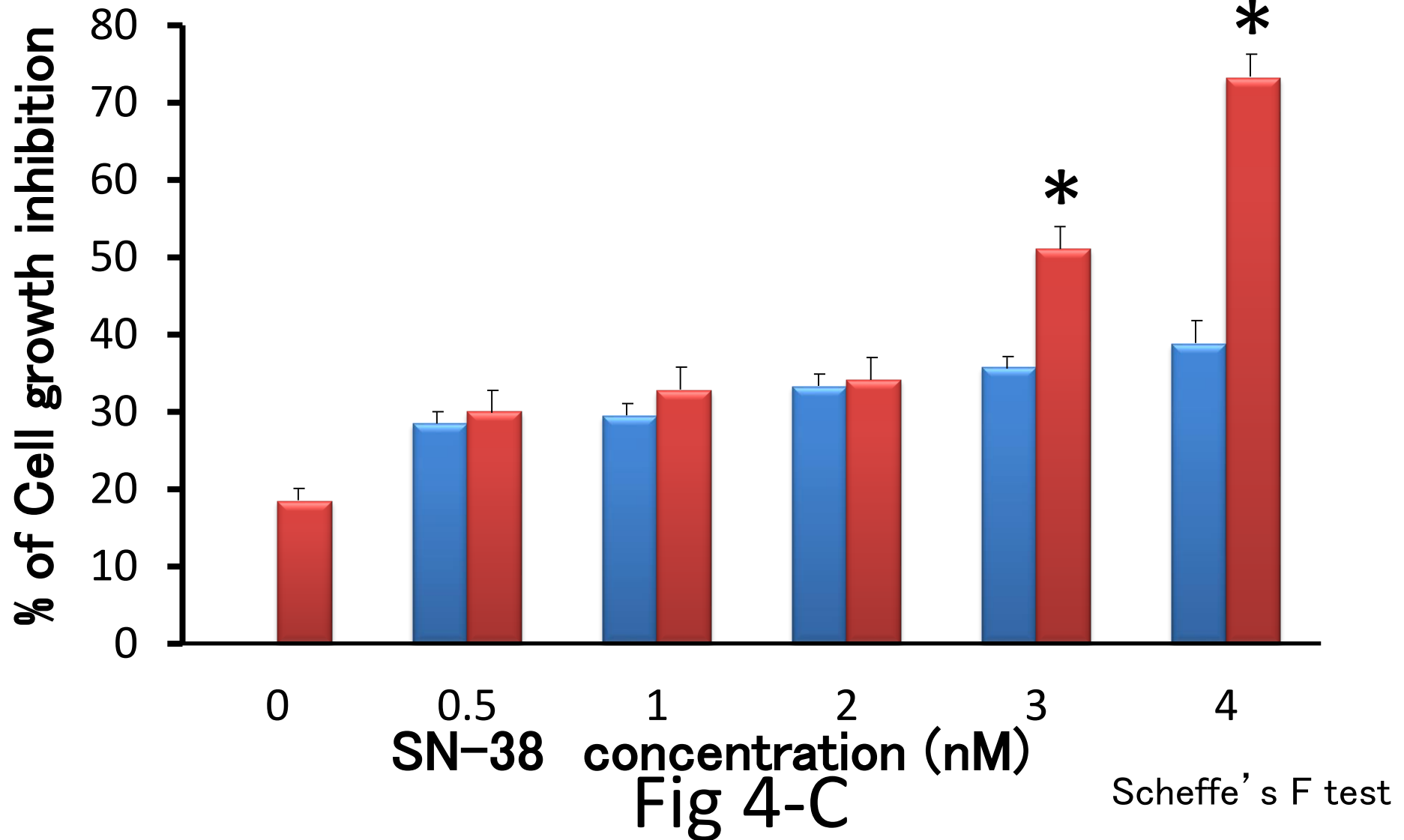


Fig 4-B

Scheffe's F test

Lapatinib (0.1 μ M)



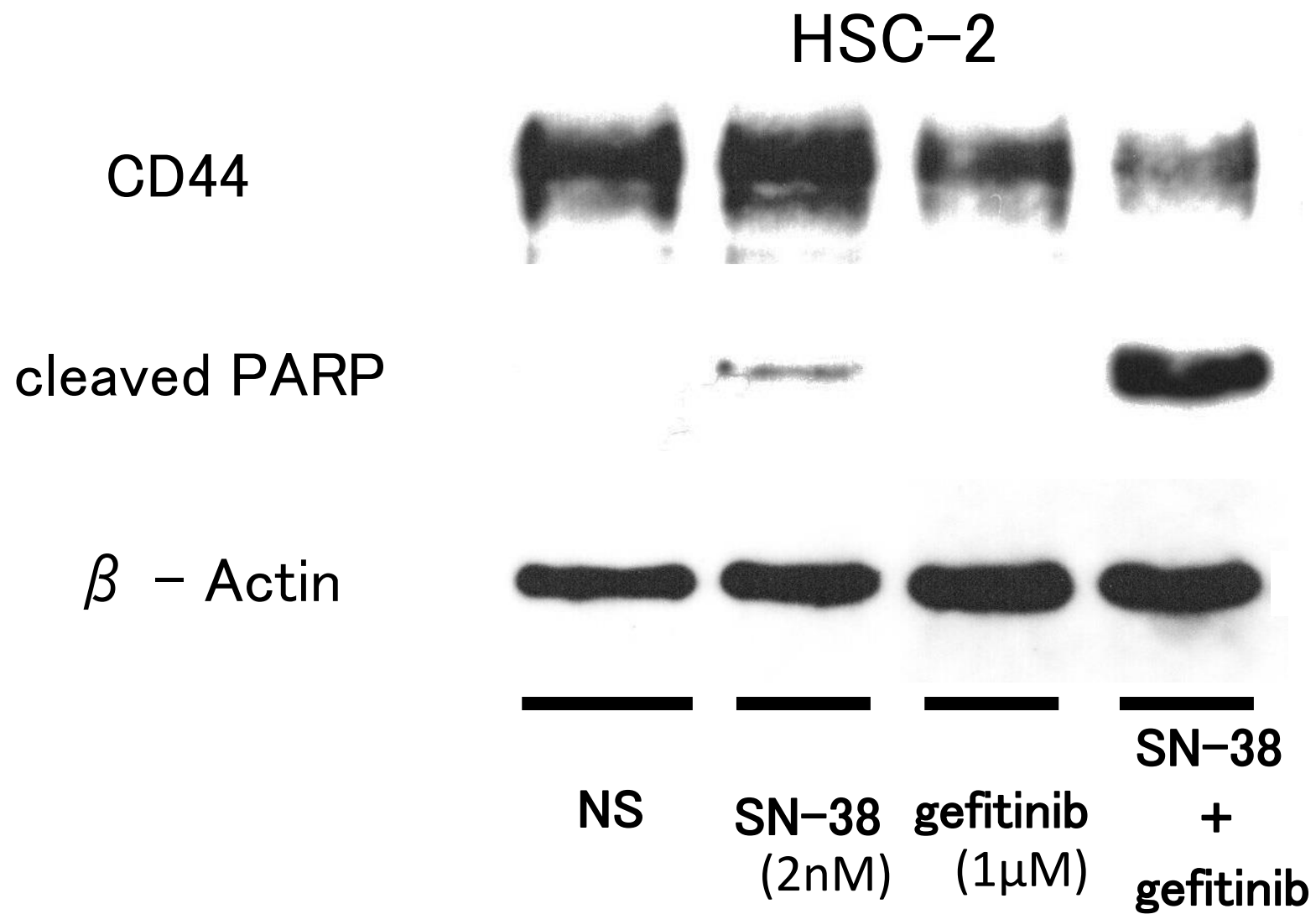


Fig 5